云 南 植 物 研 究 2010，32(3)：250～254
Acta Botanica Yunnanica DOI：10.3724/SP.J.1143.2010.09245

基于SRAP标记分析的姜花属杂交育种的亲本选择*

高丽霞[1]，刘 念[2**]，黄邦海[3]
（1 河池学院化学与生命科学系，广西 宜州 546300；2 仲恺农业工程学院，广东 广州 510225；
3 广州市农业技术推广中心，广东 广州 510520）

摘要：姜花属杂交育种的亲本选择中，除了考虑性状搭配之外，还应考虑该属的自交不亲和性带来的生殖障碍。本文通过分析姜花属20个种的22份材料和6个园艺品种的亲缘关系，探讨了亲缘关系与杂交结实率之间的关系，结果表明亲本材料的相似系数在0.4～0.6时结实率最高。结合实际育种工作，提出了姜花属亲本搭配的方法，首先从性状上进行搭配，包括苞片排列方式、香气和颜色等；另外考虑到其生殖特性，在选出的亲本过于远缘或过于近缘时，我们都必须考虑引入桥梁亲本，以集合更多的优良性状。

关键词：亲本选择；亲缘关系；结实率
中图分类号：S 336 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700(2010)03-250-05

Parental Selection in the Cross Breeding of *Hedychium* Koenig Based on SRAP Markers

GAO Li-Xia[1]，LIU Nian[2**]，HUANG Bang-Hai[3]
(1 *Department of Chemistry and Life Science*，*Hechi University*，Yizhou 546300，China；2 *Zhongkai University of Agriculture and Engineering*，Guangzhou 510225，China；3 *Guangzhou Municipal Center for the Promotion of Agricultural Technologies*，Guangzhou 510520，China)

Abstract：In the cross breeding of *Hedychium*，parental selection is related not only to the parental morphologic characters，but also to the reproducing barrier of self incompatibility. In this study，the phylogenetic relationships of 28 materials were analyzed. The results showed that parents with a similarity coefficient of 0.4－0.6 tended to have a high setting percentage after combined the relathionshipe with the setting percentages. The methods of parental selection in actual breeding work were suggested based on the present results. The characteristics，such as bract arrangements，fragrance and color，were the most important factors to be considered for cross breeding of *Hedychium*. When the parents selected were either too distant or too close，bridge parental taxon were necessary for gathering better characteristics.

Key words：Parental selection；Phylogenetic relationship；Setting percentage

姜花属（*Hedychium*）是姜科植物中最具观赏特性的类群之一。全球约80种，主要分布于亚洲的热带、亚热带地区，喜马拉雅山地区为其现代分布中心（吴德邻，1994；Branney，2005）。我国约有29种及3变种，主要分布在西南地区，海南也有分布（Wu and Larsen，2000）。

具有香味的白姜花是广州传统的香型切花，夏秋上市，弥补了这个季节香型切花不多的现状，具有巨大市场。但由于瓶插期短、品种单一，生产效益较差。因此，需要进一步研究开发

* 基金项目：广西高校重点建设实验室建设资助项目（桂西北特色资源研究与开发）
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：liunian678@163.com
收稿日期：2009-12-04，2010-01-10接受发表
作者简介：高丽霞（1980－）女，博士，主要研究方向：园林植物与观赏园艺。

具有芳香味的姜花新品种，以形成广州香型切花产业，打造行业的竞争优势，推动花卉业的产业化生产，实现农业增效，农民增收。

杂交育种的规律之一是亲缘关系越远，就有更多不同来源的性状可以结合起来，亲本的遗传基础就更大程度地被拓宽。因此，在常规育种中，远缘杂交成为主要育种手段之一。研究表明，姜花属中存在着天然的自交不易亲和的现象（Holttum，1950；高江云等，2005），其远缘杂交比种内杂交更为容易，所以我们利用远缘杂交的手段，对姜花属做了一系列的杂交试验，结果表明，姜花属的远缘杂交有着一些自身的特点：(1) 母本的结实能力对结实率起非常关键的作用；(2) 不同种间的杂交结实率有较大的差异，这些差异一方面来源于各个种结实能力的不同，另一方面源自用于杂交双亲的亲缘关系的远近。

相关序列扩增多态性（Sequence-Related Amplified Polymorphism，SRAP）标记是由美国加州大学蔬菜作物系 Li and Quiros（2001）提出。该标记多态性高、重复性好、操作简单、没有物种特异性，现已广泛应用于种质鉴定（李严和张春庆，2005）、图谱构建（林忠旭等，2003；高丽霞等，2009）、比较基因组学（Li 等，2003）和遗传多样性分析（Ferriol 等，2003）。利用分子标记进行聚类分析时，一般常用于种内分析，但也有学者用 SRAP 标记进行了属内种间的分析，并得到了理想的结果。李隆云等（2008）利用该标记对仙茅属 *Curculigo* Gaertn. 7 个国产种做的分析结果与传统形态分类的结果基本一致；Sun 等（2006）利用该标记对灵芝属 *Ganoderma* 类群进行了分析，将 31 份材料聚为 3 个类群，亦与传统形态分类的结果基本一致。

本研究利用 SRAP 标记分析姜花属 28 份材料的亲缘关系，得到种间的相似系数，同时通过材料的广泛杂交，得到不同组合的杂交结实率。最后分析相似系数与结实率的相关性，以确定姜花属中亲缘关系远近与亲本选配之间的关系，为亲本选配提供可杂交性方面的依据。

1　材料与方法

1.1　材料

28 份姜花属植物的材料（表 1）的野生种分别引自广西、云南、四川，园艺品种分别引自泰国和香港，所有材料在广州均已成功栽培。凭证标本存华南植物园标本馆（IBSC）。

杂交组合共 22 个（表 2）。杂交组合的设计参考了熊友华（2006）提出的白姜花作为母本结实率较高的结论，为了尽量消除结果分析时的母本误差，本试验较多地采用了以白姜花作为母本的组合。

1.2　方法

1.2.1　*杂交育种及结实率的统计*　姜花属植物在上午 8：00～10：00 柱头最为湿润，因此选择该时期进行人工杂交。选择即将在当日下午展开的小花，拨开花瓣（尽量不损伤花瓣），用镊子轻轻将雄蕊去除，立刻授以干燥的花粉，套袋，约一周后子房膨大。种子在果皮自然开裂时收获，立即播于湿润的花盆土中（如果外界气温过低，要转至 28℃的温室中）。幼苗长至 15 cm 左右，外界温度稳定在 20℃左右时，移栽大田。

每个杂交组合重复 3 个花序（每个花序有小花 150 个左右），分别统计结实率，结果采用平均值±标准差的形式，利用 Excel 进行统计分析。

1.2.2　*DNA 提取和 SRAP 分析的方法*　各试材取刚发出的健康嫩叶（卷状）5 g，按 Murray and Thompson（1980）的 CTAB 法进行 DNA 提取，并稍作改动。SRAP 引物参考 Vandemark 等（2006）和 Budak 等（2004）的文献中所选的引物，具体引物及筛选方法见高丽霞等（2008）。PCR 扩增反应体系和反应程序参考 Ferriol 等（2003）的方法，凝胶银染参考张军等（2000）方法，银染后的凝胶利用 Vilber Lourmat 凝胶成像仪拍摄保存。

1.2.3　*数据分析方法*　聚类分析利用 NTSYS2.10e 软件，采用 Jaccard 相似性系数、非加权组平均法（UPGMA）聚类（Sneath and Sokal，1973）。多态性片段的有无分别用“1”和“0”表示，至少同时存在于两份材料内的多态性片段为有效。

2　结果与分析

2.1　聚类分析

本试验在高丽霞等（2008）的基础上，加上用作亲本的 6 个园艺品种，选取了 30 对多态性好的引物，最后使用 28 对条带清晰、重复性好的引物，共扩增出 152 条带，其中 135 条为多态性带，占 88.8%，平均每对 4.8 条，多态性条带里最多的为引物组合 F13 和 R1，达到 13 条。聚类结果如图 1 所示。所有供试材料仍聚为 3 大类，而 6 个园艺品种与白姜花均聚在一起，说明这些园艺品种可能均不同程度地带有白姜花的血统，白姜花可能是它们的原始亲本之一。

2.2 亲缘关系与结实率的关系

表2中列出了各个组合的结实率以及它们的相似系数，经相关性分析，相关系数仅为－0.0036，可见结实率与其相似系数间并不显著相关，但与亲本，特别是母本的关系较大。从表2中可知，以白姜花作母本的杂交组合结实率最高，这也可能是现有的几个园艺品种均带有白姜花血统的原因之一。但是，单纯从以白姜花为母本的组合来看，

表1 本试验所用材料

Table 1 Materials used in this study

分类群 Taxon	采集地 Locality	凭证标本（存 IBSC）Voucher（in IBSC）
广西姜花 *H. kwangsiense*	广西那坡 Napo，Guangxi	HU061
密花姜花 *H. densiflorum*	云南六库 Liuku，Yunnan	HU082
盘珠姜花 *H. panzhuum*	四川峨眉山 Emei Mountain，Sichuan	HU043
黄姜花 *H. flavum*	广西田林 Tianlin，Guangxi	HU064
毛姜花（b）*H. villosum*	云南福贡 Fugong，Yunnan	HU090
峨眉姜花（a）*H. flavescens*（a）	四川峨眉山 Emei Mountain，Sichuan	HU044
肉红姜花 *H. neocarneum*	云南勐仑 Menglun，Yunnan	HU028
峨眉姜花（b） *H. flavescens*（b）	云南勐腊 Mengla，Yunnan	HU030
唇凸姜花 *H. convexum*	云南普洱 Puer，Yunnan	HU109
矮姜花 *H. brevicaule*	广西平孟 Pingmeng，Guangxi	HU049
无丝姜花 *H. efilamentosum*	云南六库 Liuku，Yunnan	HU085
草果药 *H. spicatum*	云南六库 Liuku，Yunnan	HU081
普洱姜花 *H. puerense*	云南普洱 Puer，Yunnan	HU016
思茅姜花 *H. simaoense*	云南思茅 Simao，Yunnan	HU018
红姜花 *H. coccineum*	云南思茅 Simao，Yunnan	HU015
盈江姜花 *H. yungjiangense*	云南盈江 Yingjiang，Yunnan	HU101
青城姜花 *H. qingchengense*	四川青城山 Qingcheng Mountain，Sichuan	HU045
圆瓣姜花 *H. forrestii*	广西凌云 Lingyun，Guangxi	HU065
滇姜花 *H. yunnanense*	云南腾冲 Tengchong，Yunnan	HU095
毛姜花 *H. villosum*	广西那坡 Napo，Guangxi	2004FL096
小毛姜花 *H. villosum* var. *tenuiflorum*	云南勐腊 Mengla，Yunnan	2004FL091
白姜花 *H. coronarium*	广东广州 Guangzhou，Guangdong	—
泰国一号 *H.* sp.1 from Thailand	泰国 Thailand	2004FL016
泰国二号 *H.* sp.2 from Thailand	泰国 Thailand	2004FL013
泰国三号 *H.* sp.3 from Thailand	泰国 Thailand	2004FL014
泰国四号 *H.* sp.4 from Thailand	泰国 Thailand	2004FL015
金姜花 *H.* sp.5	香港 Hongkong	99FL089
粉姜花 *H.* sp.6	香港 Hongkong	99FL090

表2 杂交组合与结实率、相似系数情况

Table 2 Cross-combinations and the setting percentages，the coefficients of them

编号 No.	母本×父本（♀×♂）Maternal parent × paternal parent	结实率（%）Setting percentage	相似系数 Coefficient	编号 No.	母本×父本（♀×♂）Maternal parent × paternal parent	结实率（%）Setting percentage	相似系数 Coefficient
1	白姜花×圆瓣姜花	64.91±4.69	0.30	12	白姜花×泰国四号	36.60±3.65	0.68
2	白姜花×红姜花	29.20±4.35	0.35	13	泰国三号×粉姜花	22.3±3.21	0.57
3	白姜花×金姜花	48.09±3.33	0.54	14	金姜花×粉姜花	18.2±2.17	0.63
4	白姜花×粉姜花	24.82±1.20	0.64	15	圆瓣姜花×白姜花	13.43±0.84	0.30
5	白姜花×黄姜花	62.10±13.25	0.49	16	滇姜花×白姜花	9.50±0.10	0.27
6	白姜花×峨嵋姜花	0.00	0.44	17	黄姜花×白姜花	44.36±2.83	0.49
7	白姜花×思茅姜花	76.19±12.37	0.41	18	峨嵋姜花×白姜花	0.00	0.44
8	白姜花×小毛姜花	38.51±6.02	0.29	19	泰国一号×白姜花	14.93±3.34	0.70
9	白姜花×泰国一号	41.02±2.98	0.70	20	红姜花×泰国一号	18.5±2.87	0.39
10	白姜花×泰国二号	9.60±0.53	0.67	21	金姜花×红姜花	9.01±1.27	0.40
11	白姜花×泰国三号	50.63±6.47	0.59	22	粉姜花×金姜花	18.2±2.36	0.63

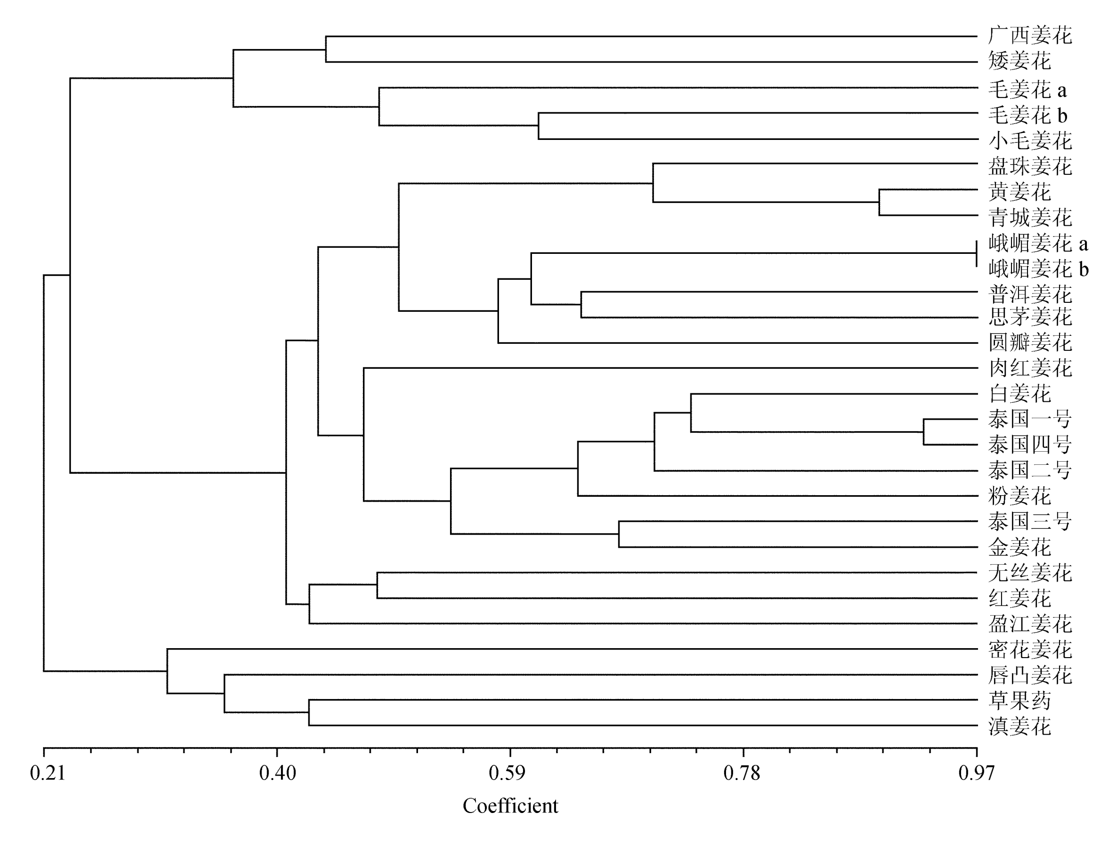


图 1　28 份姜花属材料的 UPGMA 聚类分析

Fig. 1　An unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) dendrogram of genetic relationships among 28 taxa of *Hedychium*

相似系数与结实率却又有一定的关系，当相似系数低于 0.4 时的组合，除与圆瓣姜花的组合外，结实率均低于 30%；而相似系数在 0.4～0.6 之间时的组合，除去峨嵋姜花自身不育的原因外，结实率均高于 48%；当相似系数更高时，结实率又趋于下降。可见，亲缘关系远近与姜花属的生殖特性结合起来一起影响着姜花属的亲本选配。相似系数较低时，亲缘关系较远，组合的结实率相应较低；相似系数在平均水平时，结实率最高；相似系数更大时，可能受到姜花属中普遍存在着的自交不亲和性的影响，结实率又开始下降。

3　讨论

3.1　姜花属育种的一般特性

姜花属植物的花序一般有两种，一种为苞片卷筒状排列，花序一般较长，观赏性较差；另一种为苞片覆瓦状排列，且花序缺少层次，观赏性也比较差。当两种花序的种杂交后，其后代的苞片往往会呈较短而紧密的苞片卷筒状排列，或上部苞片卷筒状而下部苞片覆瓦状排列，使得花序更有层次感和观赏性。因此，在进行亲本选择时，首先要从苞片排列方式上进行选择。其次，姜花属作为一种香型切花更显示出其开发价值。香气作为一种数量性状，不但可以在后代得到遗传，而且可以分离出丰富的香气类型，所以，用于杂交的亲本需至少有一个具有香气。此外，该属植物的颜色也绚丽多彩，根据育种目标需要进行合理的色彩搭配也是想要获得到优良后代所必需考虑的。

3.2　基于亲缘关系的亲本选择

育种的第一步是性状搭配，但对于种间杂交，亲本的亲缘关系也是必须要考虑的。在姜花属育种中，其亲本选择的层次也是如此，首先考虑姜花属育种的一般特性，其次要考虑选中亲本的亲缘关系远近。

通过杂交试验，我们发现在姜花属中进行种间杂交是比较容易成功的。所以，在实际工作中，我们可以首先考虑性状搭配。但在选中的亲

本过于远缘或过于近缘时，我们都必须考虑引入桥梁亲本，以集合更多的优良性状。

白姜花因为具有较强的结籽能力和接近于该属的亲缘关系中心，常作为桥梁亲本。除了与毛姜花和唇凸姜花的相似系数仅为0.1和0.12外，其余材料与白姜花的相似系数均高于0.2。而与毛姜花和唇凸姜花分别近缘的种小毛姜花和滇姜花均可与白姜花杂交结实，白姜花可以通过与毛姜花和小毛姜花及唇凸姜花和滇姜花的杂交种获得两个它们的性状，所以通过用白姜花作母本，可以将所有材料联系起来。另外，以白姜花作母本也是符合性状搭配的，因为该属中花序覆瓦状排列的种是非常少的，常见的仅有白姜花、黄姜花和峨眉姜花，选用白姜花作母本兼顾了性状搭配中最重要的花序排列方式的组合；白姜花香气浓郁，也符合育种目标之二的香气育种。由此，可以确定姜花属育种中的亲本选择策略，以白姜花为中心，与白姜花过于远缘的种先与其近缘种杂交，再与白姜花杂交。符合性状组合，亲缘关系又不太远的种间也可以直接杂交。

〔参 考 文 献〕

Branney TME, 2005. Hardy Ginger [M]. Portland: Timber Press

Budak H, Shearman RC, Parmaksiz I *et al*., 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. *Theroretical and Applied Genetics*, **108**: 328—334

Ferriol M, Pico B, Nuez F, 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theroretical and Applied Genetics*, **107**: 271—282

Gao JY (高江云), Ren PY (任盘宇), Li QJ (李庆军), 2005. Advances in the study of breeding system and pollination biology of gingers (Zingiberaceae and Costaceae) [J]. *Journal of Systematics and Evolution* (植物分类学报), **43** (6): 574—585

Gao LX (高丽霞), Hu X (胡秀), Liu N (刘念) *et al*., 2008. Cluster analysis of Chinese *Hedychium* based on SRAP markers [J]. *Journal of Systematics and Evolution* (植物分类学报), **46** (6): 899—905

Gao LX (高丽霞), Liu N (刘念), Huang BH (黄邦海), 2009. Linkage maps of the genus *Hedychium* (Zingiberaceae) based on SRAP [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **31** (4): 317—325

Holttum RE, 1950. The Zingiberaceae of the Malay Peninsula [J]. *Garden's Bulletin Singapore*, **13**: 1—250

Li G, Gao M, Yang B *et al*., 2003. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theroretical and Applied Genetics*, **107**: 168—180

Li G, Quiros CF, 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theroretical and Applied Genetics*, **103**: 455—461

Li LY (李隆云), Chen DX (陈大霞), Qin SY (秦松云) *et al*., 2008. Studies on genetic relationship of seven species of *Curculigo* plantfrom China using SRAP [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), **33**: 117—120

Li Y (李严), Zhang CQ (张春庆), 2005. Study on genetic diversity with a molecular marker SRAP of watermelon hybrids [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **32**: 643—647

Lin ZX (林忠旭), Zhang XL (张献龙), Nie YC (聂以春), 2003. A linkage map of cotton based on SRAP [J]. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), **48** (15): 1676—1679

Murray HG, Thompson WF, 1980. Rapid isolation of higher weight DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, **8**: 4321

Sneath PHA, Sokal RR, 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification [M]. San Francisco: Freeman

Sun SJ, Gao W, Lin SQ *et al*., 2006. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**: 537—543

Vandemark GJ, Ariss JJ, Bauchan GA *et al*., 2006. Estimating genetic relationships among historical sources of alfalfa germplasm and selected cultivars with sequence related amplified polymorphisms [J]. *Euphytica*, **152**: 9—16

Wu DL (吴德邻), 1981. Zingiberaceae [A]. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, **16** (2): 27

Wu DL (吴德邻), 1994. Geography of Zingiberaceae [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), **2**: 1—14

Wu TL, Larsen K, 2000. Zingiberaceae [A]. In: Flora of China [M]. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, **24**: 370—377

Xiong YH (熊友华), Liu N (刘念), Huang BH (黄邦海), 2006. A preliminary study on the interspecific cross breeding of *Hedychium* [J]. *Guangdong Agricultural Sciences* (广东农业科学), **12**: 24

Zhang J (张军), Wu YT (武耀廷), Guo WZ (郭旺珍) *et al*., 2000. Fast screening of microsatellite markers in cotton with PAGE/silver Staining [J]. *Acta Gossgpii Sinica* (棉花学报), **12** (5): 267—269